

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	K	
JP 58047499	A	19830319			198317	B	

Priority Applications (No Type Date): JP 81144568 A 19810916

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 58047499	A	8		

Abstract (Basic): JP 58047499 A

The determin. of components of vital body fluids (i.e. substrates or enzymes) comprises colorimetric determin. of hydrogen peroxide produced by a redox reaction based on colour development due to oxidative concensn. between 4-aminoantipyrine or 3-methyl-2-benzothiazolino hydrazone (MBTH) and N-ethyl -N-sulpho-propyl-m-toluidine (ESPT) in the presence of peroxidase. The improvement comprises classifying all the reagents into those contg. a substrate or enzyme that directly acts on the component to be determined, 4-aminoantipyrine or MBTH and others contg. ESPT and peroxidase, and previously removing interfering substances present in samples by using the latter reagents.

In the absence of 4-aminoantipyrine or MBTH, ESPT changes per se into a colourless substance by hydrogen peroxide, which is produced by interfering substances, in the presence of peroxidase and at the same time exhausts hydrogen peroxide.

Title Terms: DETERMINE; BODY; FLUID; COMPONENT; COLORIMETRIC; DETERMINE; HYDROGEN; PEROXIDE; OBTAIN; REDOX; OXIDATION; CONDENSATION

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12Q-001/28; G01N-021/76; G01N-033/50

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C; B05-C08; B06-F01; B07-D08; B10-A09B; B11-C07B; B12-K04; D05-A02

Chemical Fragment Codes (M1):

\*02\* M423 M750 M903 N102 P831 Q233 V802 V810  
\*03\* M423 M430 M782 M903 P831 Q233 V802 V811

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* C101 C408 C550 C730 C800 C801 C802 C804 C805 C807 M411 M750 M903  
M910 N102 P831 Q233  
\*04\* F011 F012 F013 F014 F015 F512 G010 G100 H1 H100 H121 H2 H212 J5 J521  
L9 L941 M210 M211 M240 M273 M281 M320 M413 M430 M510 M521 M531 M540  
M782 M903 P831 Q233 Q505  
\*05\* D013 E600 H2 H211 K0 K6 K630 M210 M211 M273 M281 M320 M412 M430 M511  
M520 M530 M540 M782 M903 P831 Q233 Q505  
\*06\* G012 G100 H1 H103 H141 K0 K4 K431 M210 M211 M212 M240 M273 M281 M313  
M321 M331 M332 M340 M342 M373 M391 M414 M430 M510 M520 M531 M540  
M782 M903 P831 Q233 Q505

Chemical Fragment Codes (M6):

\*07\* M903 P831 Q233 Q505 R514 R613 R623 R624 R632 R639

Derwent Registry Numbers: 1732-U

5/9/2 (Item 1 from file: 345)

DIALOG(R) File 345: Inpadoc/Fam. & Legal Stat

(c) 2001 EPO. All rts. reserv.

4147464

Basic Patent (No,Kind,Date): JP 58047499 A2 830319 <No. of Patents: 001>

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 58047499 A2 830319

MEASUREMENT OF COMPONENT OF LIVING BODY SOLUTION (English)

Patent Assignee: YATORON KK

Author (Inventor): NOUCHI FUMIO; NISHIDATE KAZUYOSHI

Priority (No,Kind,Date): JP 81144568 A 810916

Applic (No,Kind,Date): JP 81144568 A 810916

IPC: \* C12Q-001/28; G01N-021/76; G01N-033/50; G01N-033/60

CA Abstract No: \* 98(25)212560F  
Derwent WPI Acc No: \* 83-40636K  
JAPIO Reference No: \* 0135C000049  
Language of Document: Japanese

5/9/3 (Item 1 from file: 347)  
DIALOG(R) File 347:JAPIO  
(c) 2001 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

01110099  
MEASUREMENT OF COMPONENT OF LIVING BODY SOLUTION

PUB. NO.: 58-047499 A]  
PUBLISHED: March 19, 1983 (19830319)  
INVENTOR(s): NOUCHI FUMIO  
NISHIDATE KAZUYOSHI  
APPLICANT(s): YATORON KK [325408] (A Japanese Company or Corporation), JP  
(Japan)  
APPL. NO.: 56-144568 [JP 81144568]  
FILED: September 16, 1981 (19810916)  
INTL CLASS: [3] C12Q-001/28; G01N-021/76; G01N-033/50; G01N-033/60  
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.2  
(SANITATION -- Medical); 46.2 (INSTRUMENTATION -- Testing)  
JOURNAL: Section: C, Section No. 170, Vol. 07, No. 135, Pg. 49, June  
11, 1983 (19830611)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To measure accurately the desired component, by dividing all reagents into a group consisting of a substrate or an enzyme to be reacted with the desired component and 4-antipyrine or MBTH and a group consisting of ESPT and peroxidase, removing previously an interfering substance in a specimen using the latter.

CONSTITUTION: All reagents are divided into a group consisting of a substrate or an enzyme to be directly reacted with the desired component in a specimen and 4-aminoantipyrine or 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazine and another group consisting of N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine and peroxidase. The latter reagents are used for removing previously an interfering substance coexisting in a specimen, the desired substance is then reacted with the former reagents, the emission is determined by colorimetry to measure the desired component.

?s an,pn=jp 8201393

0 AN=JP 8201393

3 PN=JP 8201393

S6 3 AN,PN=JP 8201393

?t s6/9/all

6/9/1 (Item 1 from file: 351)  
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010874496  
WPI Acc No: 1996-371447/199637  
XRAM Acc No: C96-117945

Qualitative analysis of cholesterol in high density lipoprotein(s) - by adding complex forming substance and surfactant and enzymatically measuring amt.

Patent Assignee: DAIICHI PURE CHEM CO LTD (DAUC ); DAIICHI KAKAGU YAKUHIN KK (DAUC ); DAIICHI KAGAKU YAKUHIN KK (DAUC )

Inventor: HINO K; MANABE M; NAKAMURA M

Number of Countries: 025 Number of Patents: 015

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
WO 9623902	A1	19960808	WO 95JP641	A	19950403	199637	B
JP 8201393	A	19960809	JP 9513607	A	19950131	199642	
AU 9520852	A	19960821	AU 9520852	A	19950403	199648	
EP 753583	A1	19970115	EP 95913411	A	19950403	199708	

L7 ANSWER 1 OF 1 CA COPYRIGHT 2003 ACS  
AN 98:212560 CA  
TI Determination of body fluid components  
PA Yatoron K. K., Japan  
SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 8 pp.  
CODEN: JKXXAF

DT Patent  
LA Japanese

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 58047499	A2	19830319	JP 1981-144568	19810916 <--
PRAI	JP 1981-144568		19810916		

AB During the detn. of body fluid components based on a redox reaction by reaction of the sample with peroxidase, 4-aminoantipyrine or 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, the sample is pretreated with N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine (I) and peroxidase for the removal of interfering substances. Thus, a serum sample contg. triglycerides was treated with a reagent contg. glycerol kinase, L-glycerol 3-phosphate oxidase, peroxidase, ATP, I, MgCl<sub>2</sub>, Triton X 100, and Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 37.degree. for 5 min for the removal of free glycerol, followed by treatment with a reagent contg. lipoprotein lipase, 4-aminoantipyrine, Triton X 100 and Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 37.degree. for 10 min and colorimetric anal. at 550 nm for the detn. of serum triglycerides. alpha.-Amylase was also detd. in blood serum.

IC C12Q001-28; G01N021-76; G01N033-50; G01N033-60

CC 9-5 (Biochemical Methods)  
Section cross-reference(s): 7

ST serum triglyceride detn enzymic colorimetry; amylase detn serum enzymic colorimetry

IT Blood analysis  
(amylase and triglycerides detn. in, of humans, enzymic-colorimetric)

IT Glycerides, analysis  
RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)  
(detn. of, in human blood serum, enzymic-colorimetric)

IT Spectrochemical analysis  
(colorimetric, for triglycerides)

IT 9000-90-2  
RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)  
(detn. of, in human blood serum, enzymic-colorimetric)

IT 9003-99-0 36783-03-6  
RL: ANST (Analytical study)  
(in triglycerides detn. in human blood serum)

=>

Triton X-100  
nonionic detergent

Seth  
1/6/03

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開  
⑪ 公開特許公報 (A) 昭58-47499

⑫ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 Q 1/28  
G 01 N 21/76  
33/50  
33/60

識別記号

厅内整理番号  
6543-4B  
6637-2G  
6422-2G  
6422-2G

⑬ 公開 昭和58年(1983)3月19日  
発明の数 1  
審査請求 有

(全 8 頁)

⑭ 生体液中の成分の測定方法

⑮ 特願 昭56-144568  
⑯ 出願 昭56(1981)9月16日  
⑰ 発明者 野内文夫  
松戸市小金原6-9-20

⑱ 発明者 西館和由

八千代市村上1113番の1

⑲ 出願人 株式会社ヤトロン  
東京都千代田区東神田1丁目11  
番4号

⑳ 代理人 弁理士 山下義平

*See a good  
classmate*

明細書

1. 発明の名称 生体液中の成分の測定方法

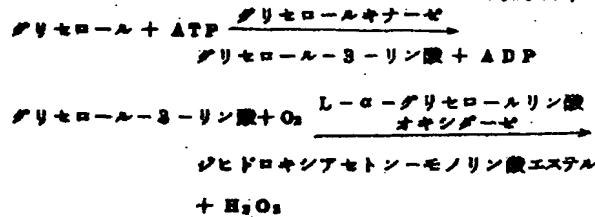
2. 特許請求の範囲

生体液中の成分の測定にレドツクス反応を適用し生成する過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下、酸化総合により発色する発色剤により比色定量することにより目的成分を測定する方法において金試薬を目的成分に直接作用する基質又は酵素および4-アミノアンチビリンあるいは3-メチル-2-ベンゾチアソリノンヒドラゾンを含むものと、N-エチル-N-スルホプロピル-ヨートルイジン及びペルオキシダーゼを含むその他のものとに分け、後者の試薬を用い予め検体中に共存する妨害物質を除去することを特徴とする生体液中の成分の測定方法。

3. 発明の詳細な説明

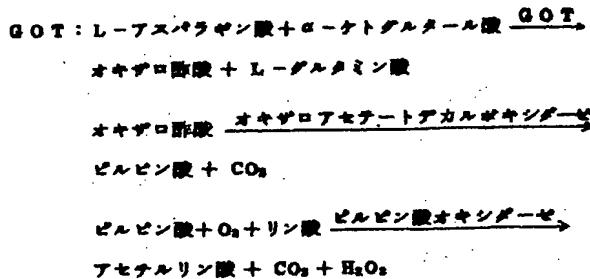
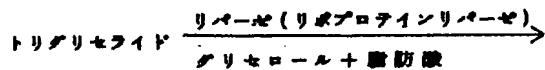
本発明は生体液中の成分、すなわち基質または酵素活性を主としてレドツクス反応を使用して測定するに当たり共存する妨害物質を

-エチル-N-スルホプロピル-ヨートルイジン(以下E S P Tといふ)の特異な性質を利用して除去する方法に関する。さらに詳しくは生体液中の成分の測定にレドツクス反応を適用し定量的に生成する過酸化水素を、ペルオキシダーゼの存在下、4-アミノアンチビリンあるいは3-メチル-2-ベンゾチアソリノンヒドラゾン(以下M B T Hといふ)とE S P Tとの酸化総合による発色に基づき比色定量することにより検体中の目的成分を測定する方法において検体中に共存する妨害物質が反応の過程で過酸化水素を生成し、その過酸化水素が目的成分の測定結果に誤差を生じる虞のある場合、E S P Tの特性すなわち酸化総合の相手方(この場合4-アミノアンチビリンあるいはM B T H)が存在しない場合ペルオキシダーゼの存在下過酸化水素によりE S P T自身が酸化すると同時に存在する過酸化水素を消滅すること、しかも変化した物質が無色であること、更にE S P Tは水

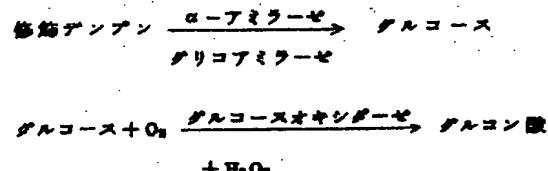


毒性のため漏りを生じないこと（トライジンは一般的に難溶性で漏る）ことを利用して子ぬ妨害物質を除去した後検体中の成分を正確に測定する方法に関する。

本発明でいレドックス反応で過酸化水素を生成する反応を利用する最も簡単なものには酵素グルコースオキシダーゼを用いるグルコースの測定方法、あるいは酵素ウリカーゼを用いる尿酸の測定方法がある。また一方目的の成分に何らかの処理を施こし例えば酵素を作用してレドックス反応の基質に導き、次いで酸化酵素を用いて過酸化水素を生成しこれを比色定量する方法がある。この場合反応の途中に種々の中間体を経て最後にレドックス反応が行なわれることが多いのでそれだけ検体中に共存する妨害物質の影響を受け易い。例えば(1)トリグリセライドの測定は次の反応により行なわれる。

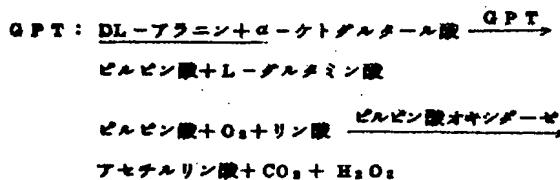


これらの場合検体中のビルピン酸が測定値に正誤差を与える。因に人血清中のビルピン酸は通常約 0.1 mmol/l であるが病的にはさらに増加することがある。また(2)α-アミラーゼ活性測定は次の反応により行なわれる。



上記原理によるα-アミラーゼ活性の測定においては検体中のグルコースが正誤差を与え

上記原理によるトリグリセライド測定においては検体中のグリセロールが測定値に正誤差を与えることは明らかである。因に人血清中には約 0.1 mmol/l のグリセロールが含まれておりトリオレイン換算約 8 mg/dl に相当するが時には（例えば透析患者血清）さらに高くなることもある。また(2)トランスアミナーゼ (GOT, GPT) 活性測定は次の反応により行なわれる。



ことになる。因に人血清中のグルコースは約 0.1 mmol/l であるが病的には非常に増加することがある。

以上の例のほかアルコール脱水素酵素、ミオキナーゼ、ビルピン酸オキシダーゼを組合せた過酸化脂肪酸の測定の場合のビルピン酸、あるいはホスホリバーゼ-D、コリンオキシダーゼを組合せたリン脂質測定の場合のコリン等の妨害物質の影響を取り除くために本発明方法は有効であり、さらに今後開発される測定方法への適用も充分考えられる。

従来これら妨害物質の影響を取り除くためには目的の成分に直接反応する酵素あるいは基質を除いた条件でそれ以外は全く同じ方法で測定する所調検体盲検値を測定しこれを全検体の測定値から差引くことが一般に行なわれている。しかしこれは操作、計算が煩雑でありさらに精度も劣る。また他の方法としては始めに目的の成分に変化を与えない条件で共存する妨害物質を消尽し生成する過酸化水素

をカタラーゼを加えて除去した後でカタラーゼ阻害剤を加えた後目的成分の測定反応を実施する方法があるが、この場合にはカタラーゼ阻害剤を必要とし試薬組成、操作が複雑となるばかりでなくカタラーゼ阻害剤であるシアンナトリウムは公害上問題がありまたアシ化ナトリウムは酸性条件下アシ化水素を発生する等の障害がある。

本発明者等はこれら従来技術の欠点を取除くため種々研究し、EBPTの特性すなわちEBPTは酸化結合の相手方が存在しないときはペルオキシダーゼの存在下過酸化水素を消費してそれ自身が発色することなく変化するという知見に基づき研究を重ねた結果本発明を完成した。

本発明は生体液中の成分すなわち基質または酵素活性の測定にレドックス反応を適用し定量的に生成する過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下、酸化結合により発色する発色剤により比色定量することにより検体中の目的物質を測定する。

0～1.0 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度の系列の夫々0.02 mlを採りこれに試薬(1) 1.5 mlを加え37°C、5分間加温後試薬(2) 1.5 mlを加えこれにさらには0～1.0 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度の系列を夫々0.02 ml加え5分間放置後波長550 nmで吸光度を測定する。その結果を表1に示す。数値は吸光度を表わす。

的の成分を測定する方法について、始めに試薬の中、目的の成分に直接作用する基質あるいは酵素および4-アミノアンチビリンあるいはBHTを含むものとEBPTおよびペルオキシダーゼその他を含むものとに分け、後者の試薬を用い予め検体中に共存する妨害物質を除去することを特徴とする生体液中の成分の測定方法を提供する。本発明の方法により検体中の妨害物質の影響を受けないかつ正確な生体液中の成分の測定が可能となる。

次に試験例により本発明の効果を説明する。

#### 試験例 1. 妨害物質としての過酸化水素の除去

##### 効果：

##### 1. 試薬

(1) ペルオキシダーゼ	0.01 mg/ml
EBPT	1.0 mmol/l
を含む 0.1 mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8)	
(2) 4-アミノアンチビリン	0.8 mmol/l
を含む 0.1 mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8)	

##### 2. 測定

		0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.0
		mmol/l						
検体に添加した H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> の 濃度	検体から添 えたH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> の濃度	0	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
		0	0.104	0.104	0.103	0.104	0.104	0.104
0.4	0.2 mmol/l	0.210	0.210	0.211	0.210	0.211	0.209	0.209
		0.6	0.313	0.312	0.313	0.314	0.313	0.313
0.6	0.6 mmol/l	0.419	0.420	0.420	0.418	0.419	0.419	0.419
		1.0	0.522	0.522	0.521	0.523	0.522	0.523

上表から4-アミノアンチビリンを加える前に存在した過酸化水素はペルオキシダーゼ、ESPTにより完全に除去され、後の過酸化水素の測定に全く影響を与えていないことが明らかである。

**試験例2.妨害物質としてのグルコースの除去効果:**

**1. 試薬**

(1) ムタロターゼ	10 U/ml
グルコースオキシダーゼ	$2 \times 10^4$ U/ml
ペルオキシダーゼ	$2 \times 10^4$ U/ml
ESPT	1.0 mmol/l
を含むホウ酸緩衝液 (pH 6.5)	
(2) 4-アミノアンチビリン 0.4 mmol/l	
を含むホウ酸緩衝液 (pH 6.3)	

**2. 測定**

上記試薬を用いて次の三つの試験を行なつた。

(1) グルコース標準液 0 ~ 400 mg/dl の系列および3例の血清の夫々 2.0 ml

を採り試薬(1) 2 ml を加え 37°C、5 分間放置後試薬(2) 2 ml を加えさらK 37°C、10 分間放置後波長 550 nm で吸光度を測定する。

(2) 上記グルコース標準液系列および血清の夫々 2.0 ml を採り試薬(1) 2 ml および試薬(2) 2 ml を同時に加え混合し 37°C、10 分間放置後波長 550 nm で吸光度を測定する。

(3) グルコース標準液 100 mg/dl 2.0 ml を採りこれに試薬(1) 2 ml を加え 37°C、5 分間放置後試薬(2) 2 ml を加えさらに上記グルコース標準液系列および血清の夫々 2.0 ml を加え 37°C、10 分間放置後波長 550 nm で吸光度を測定する。

上記三つの測定結果を次の表2に示す。数値は吸光度を表わす。

表 2

検 体	測定(1)	測定(2)	測定(3)
水	0.006	0.006	0.006
グルコース標準液 100 mg/dl	0.006	0.357	0.358
〃 200 "	0.006	0.709	0.707
〃 300 "	0.006	1.050	1.051
〃 400 "	0.007	1.700	1.695
血 清 1	0.008	0.408	0.405
〃 2	0.007	0.488	0.489
〃 3	0.009	0.527	0.525

上表から次のことがいえる。

測定(1)からグルコースは濃度の如何に拘らず試薬(1)で処理することにより除去できることが、また測定(2)からは試薬(1)、試薬(2)を混合して用いることによりグルコースの種々の濃度における測定が可能であることが、また測定(3)からは試薬(1)で最初に存在するグルコースを予め除去した後同じ反応液に試薬(2)を

用いて種々の濃度のグルコースの測定が可能であることが明らかである。しかも測定(2)と測定(3)の結果が測定誤差範囲で一致していることは最初に存在する妨害物質としてのグルコースを本発明の方法で除去しても後のグルコースの測定に何ら影響を与えないことが判明した。

**試験例3.妨害物質としてのビルビン酸の除去効果:**

**1. 試薬**

(1) テアミンピロホスフェート	0.8 mmol/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mmol/l
MgCl <sub>2</sub>	20 mmol/l
ESPT	1.0 mmol/l
ペルオキシダーゼ	0.01 mg/ml
ビルビン酸オキシダーゼ	7 U/ml
を含む 0.1 mol/l ジメチルグルタレート緩衝液 (pH 7.2)	
(2) 4-アミノアンチビリン	0.8 mmol/l
を含む 0.1 mol/l ジメチルグルタレート緩衝液 (pH 7.2)	

## ト酸ナトリウム (pH 7.2)

## 2. 測定

上記試薬を用いて二つの試験を行なつた。

- (1) ピルビン酸標準液 0.1 mmol/l, 1.0 mmol/l および 1.5 桿の血液の夫々 20 μl を採り試薬(1) 1.5 μl を加え 37°C, 5 分間放置後試薬(2) 1.5 μl を加えさらに 37°C, 10 分間放置後試薬プランクを対照に波長 550 nm で吸光度を測定する。
- (2) 上記ピルビン酸標準液および血液の夫々 20 μl に試薬(1) 1.5 μl と試薬(2) 1.5 μl を同時に加え混合し 37°C, 10 分間放置後試薬プランクを対照に波長 550 nm で吸光度を測定する。

上記二つの測定結果を次の表 3 に示す。数値は吸光度を表わす。

検体	測定(1)	測定(2)
ピルビン酸液 0.1 mmol/l	0.000	0.016
" 1.0 mmol/l	0.002	0.164
血清 1	0.002	0.006
2	0.003	0.098
3	0.003	0.014
4	0.002	0.07
5	0.002	0.04
6	0.001	0.002
7	0.002	0.003
8	0.003	0.004
9	0.003	0.03
10	0.002	0.002

上表からピルビン酸についても試験例 1, 2 と同様本発明が有効であることが明らかである。

## 試験例 4. 防害物質としてのグリセロールの除去効果:

## 1. 試薬

- (1) グリセロールキナーゼ 13 U/l  
L-グリセロール-3-リン酸酸化酵素 1300 U/l  
ペルオキシダーゼ  $3 \times 10^4$  U/l  
アデノシン三リボヌcléート 0.4 mmol/l  
ESPT 1.0 mmol/l  
 $MgCl_2$  2 mmol/l  
トリトン X-100 1 g/l  
を含む 1.00 mmol/l トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0)
- (2) 4-アミノアンチビリン 0.8 mmol/l  
トリトン X-100 1 g/l  
を含む 1.00 mmol/l トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0)

## 2. 測定

上記試薬を用いて次の三つの試験を行なつた。

- (1) グリセロール標準液 0 ~ 1.000 mg/dl (トリグリセライド換算) の系

列の夫々 20 μl を採り、試薬(1) 1.5 μl を加え 37°C, 5 分間放置後、試薬(2) 1.5 μl を加えさらに 37°C, 10 分間放置後波長 550 nm で吸光度を測定する。

- (2) 上記グリセロール標準液系列の夫々 20 μl を採り試薬(1) 1.5 μl および試薬(2) 1.5 μl を同時に加え混合し、37°C, 10 分間放置後波長 550 nm で吸光度を測定する。
- (3) グリセロール標準液 1.00 mg/dl (トリグリセライド換算) 20 μl を採りこれに試薬(1) 1.5 μl を加え 37°C, 5 分間放置後試薬(2) 1.5 μl を加えさらに上記グリセロール標準液系列を加え 37°C, 10 分間放置後波長 550 nm で吸光度を測定する。

上記三つの測定結果を第 1 図に示す。

第 1 図から次のことがいえる。

測定(1)からグリセロールは濃度の如何に拘

らず試薬(1)で処理することにより除去できることが、また測定(2)からは試薬(1)、試薬(2)を混合して用いることによりグリセロールの種々の濃度における測定が可能であることが、また測定(3)からは試薬(1)で最初に存在するグリセロールを予め除去した後同じ反応液に試薬(2)を用いて種々の濃度のグリセロールの測定が可能であることが明らかである。しかも測定(2)と測定(3)の結果が測定誤差範囲で一致していることは最初に存在する妨害物質としてのグリセロールを本発明の方法で除去しても後のグリセロールの測定に何ら影響を与えないことが判明した。

次に実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

#### 実施例 1. 血清中のトリグリセライドの測定

##### 1. 試薬

(1) グリセロールキナーゼ	13 U/l
L-グリセロール-3-リン酸脱化酵素	
	1300 U/l

ての血清間反応も消去される。

次に試薬(2) 1.5 ml も加え混合し 37°C, 10 分間放置後波長 550 nm で吸光度を測定する。この方法では血清中に通常存在する遊離グリセロールの少くとも 20 倍量すなわち 2 mmol/l (トリグリセライド 1300 mg/dl 相当) まで消去できるので日常の臨床検査では特別の操作を加えることなく血清中のトリグリセライドの定量が可能である。

透析患者血清 46 例を用い(1)本発明方法 (前処理を行ない遊離グリセロールを消去して中性脂肪を測定する方法) (2)無処理の方法 (前処理を行なわないで遊離グリセロールと中性脂肪を測定する方法) (3)別処理方法 (2)無処理の方法から遊離グリセロールを別に測定して差し引く方法) とを比較した結果は第 2 図及び第 3 図の通りである。

第 3 図で相関は次のとおりである：

特開昭58-17499(6)	
ペルオキシダーゼ	3×10 <sup>4</sup> U/l
アノシントリフオスフェート	0.4 mmol/l
ESPT	1.0 mmol/l
MgCl <sub>2</sub>	2 mmol/l
トリトン X-100	1 g/l
を含む 100 mmol/l トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0)	
リバーゼ (リボプロテインリバーゼ作用を有する)	5×10 <sup>4</sup> U/l
4-アミノアンチビリン	0.8 mmol/l
トリトン X-100	1 g/l
を含む 100 mmol/l トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0)	

#### 2. 測定

検体血清 2.0 ml に試薬(1) 1.5 ml を加え 37°C, 5 分間加温し血清中に存在する妨害成分である遊離グリセロールを消去する。この場合妨害物質の大部分は遊離グリセロールであるがその他のグリセロールキナーゼ以下の反応に関与する物

$$\text{回帰式 } y = 1.35x + 1.02$$

$$\text{相関係数 } R = 0.966$$

第 3 図で相関は次のとおりである：

$$\text{回帰式 } y = 0.99x - 1.3$$

$$\text{相関係数 } R = 0.999$$

無処理の方法は、検体 2.0 ml を採り、試薬(1) 1.5 ml と試薬(2) 1.5 ml を同時に混合し、37°C, 10 分間放置後波長 550 nm で吸光度を測定する。

遊離グリセロールのみを測定する方法は試薬(1) 1.5 ml と試薬(2)からリバーゼのみを除いた試薬 1.5 ml を同時に混合し、37°C, 10 分間放置後波長 550 nm で測定する。

以上のことから、本発明法は、無処理とは第 2 図のように一致しないが、別処理の方法とは第 3 図のように、非常によく一致することが明らかである。

#### 実施例 2

血清中の β-アミラーゼの活性測定法

## 1. 試薬

(1) グルコアミラーゼ	15 U/ml
グルコースオキシダーゼ	$2 \times 10^4$ U/ml
ペルオキシダーゼ	10 U/ml
ムタロターゼ	10 U/ml
B S P T	2 mmol/l
KCl	80 mmol/l
CaCl <sub>2</sub>	7 mmol/l
を含む 4.0 mmol/l ホウ酸緩衝液 (pH 6.5)	

(2) 4-アミノアンチビリン	0.4 mmol/l
修飾テンブン	5 mg/ml
を含む 2.00 mmol/l マレイン緩衝液 (pH 6.3)	

(3) クエン酸	0.6 mmol/l
を含む水溶液	

## 2. 測定

2例の検体 2.0 ml に、グルコール標準液 0 ~ 4.00 mg/dl の系列を 2.0 ml さらに採り、試薬(1) 2 ml を加え、37℃、

5分間加温し、検体中および添加したグルコースを消去する。次に試薬(2) 2 ml を加えて混合し、37℃で正確に 10 分間加温後、試薬(3)を 1 ml 加えた後、波長 550 nm で吸光度を測定する。

この方法では、血清中に通常存在するグルコースの少なくとも 5 倍量すなわち約 3.0 mmol/l まで消去できるので、日常の臨床検査では、特別の操作を加えることなく血清中の 4-アミラーゼ活性測定が可能である。

表 4

検体 (IU/l)	添加グルコース (mg/dl)	0	100	200	400
大鼠由来の 4-アミラーゼ	561	557	558	559	
血清	239	245	234	242	

以上のことから、検体中のグルコースに影響されず 4-アミラーゼ活性を測定可能で

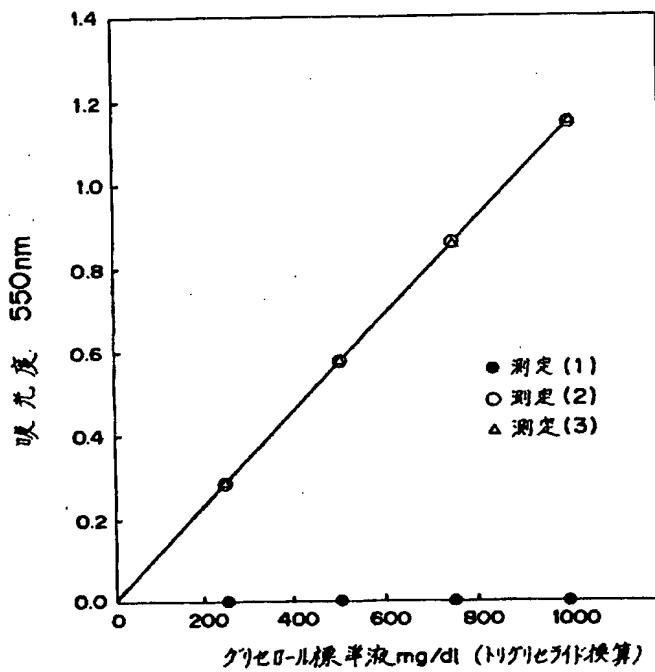
ある。

以上述べた通り本発明方法は血清中の目的成分の測定に本来必要な試薬のみを用いて予め妨害物質を除去することができ、それ以外の特別の試薬あるいは特別の操作によつて共存する妨害物質を除去することなく、また検体プランクを求めて妨害物質の影響を除去する等の余分の操作も行なわずに簡単かつ精度よく目的成分を測定することができるもので日常の臨床検査に当つて極めて有用である。

## 4. 図面の簡単な説明

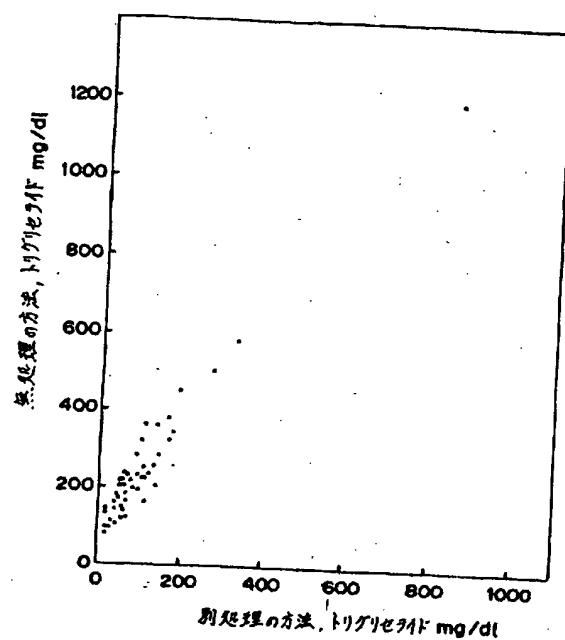
第 1 図はグリセロール標準液と吸光度との関係を示すグラフであり、第 2 図は別処理の方法によるトリグリセライド測定と無処理の方法によるトリグリセライド測定との相関を示すグラフであり、第 3 図は本発明方法によるトリグリセライド測定と別処理の方法によるトリグリセライド測定との相関を示すグラフである。

第 1 図



第 2 図

特開昭58-17433(8)



第 3 図

